

MICROORGANISM PRODUCING CELL WALL HYDROLASE

Publication number: JP10136976

Publication date: 1998-05-26

Inventor: GYOKU SHOKO; KIN SOEI; BE TOKUN; GO TOKAN;
NAN SHOYU; RO YOKUGEN; RYU SHUGEN

Applicant: PLUMWON KK; RYU SHUGEN

Classification:

- international: C12N1/20; C12N9/14; C12N9/24; A61K38/46;
C12N1/20; C12N9/14; C12N9/24; A61K38/43; (IPC1-7):
A61K38/46; C12N1/20; C12N9/14; C12N1/20;
C12R1/07; C12N9/14; C12R1/07

- european:

Application number: JP19970143499 19970515

Priority number(s): KR19960016051 19960515

Report a data error here

Abstract of JP10136976

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a microorganism producing hydrolases which decompose cell walls of Streptococcus mutans, i.e., a bacterium causing dental caries. **SOLUTION:** Cell wall hydrolases produced by Bacillus sp. YU-1005 (KCCM-10090) are separately isolated as two kinds consisting of a single molecule (YU 103) having a molecular weight of 27,000 dalton and a single molecule (YU 104) having a molecular weight of 45,000 dalton, and their optimum pH and temperature are 8.0 and 60 deg.C, respectively. The hydrolases produced by the Bacillus sp. can be used as active component of a food, a tooth paste or a medicine in the form of liquid, paste or solid.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-136976

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月26日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
9/14		9/14	
// A 6 1 K 38/46	AD Z	A 6 1 K 37/54	AD Z
(C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:07)			

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-143499

(22) 出願日 平成9年(1997) 5月15日

(31) 優先権主張番号 1 9 9 6 P 1 6 0 5 1

(32) 優先日 1996年 5月15日

(33) 優先権主張国 韓国 (K R)

(71) 出願人 597076772

株式会社ブルムウォン

大韓民国忠清北道槐山郡道安面光德里456番地

(71) 出願人 597076783

柳 洲鉉

大韓民国ソウル市西大門区新村洞134番地
延世大学校内

(72) 発明者 玉 承昊

大韓民国ソウル市江北区樊 1 洞46-79

(74) 代理人 弁理士 小林 雅人 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞壁加水分解酵素を産生する微生物

(57) 【要約】

【課題】 むし歯を発生させる細菌であるストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産成する微生物を提供する。

【解決手段】 本発明の発明者は、ストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産成する微生物を分離し、そしてその微生物を、形態学、生化学及び生理学の観点から公知の株とは完全に異なる、バチルス エスピー (Bacillus sp.) と特定した。更に、発明者らは、その微生物が従来の細胞壁加水分解酵素とは全く異なる物理化学的特徴を有する新規な加水分解酵素を産生することを発見した。バチルス エスピー YU-1005 (KCCM-10090) によって産生された細胞壁加水分解酵素は、27,000ダルトンの分子量を有している単量体 (YU 103) と、45,000ダルトンの分子量を有している単量体 (YU 104) の二種類としてそれぞれ単離され、それらの至適 pH と温度は 8.0 及び 60℃ であった。本発明のバチルス エスピー により産生された加水分解酵素は、液体、ペースト又は固体として、食品、歯磨き及び薬品の活性成分として適用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産生するバチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090)。

【請求項2】 27,000ダルトンの分子量を有している単量体である請求項1に記載のバチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) により産生された加水分解酵素。

【請求項3】 45,000ダルトンの分子量を有している単量体である請求項1に記載のバチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) により産生された加水分解酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、むし歯（齲蝕）を発生させる細菌であるストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産成する微生物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】歯は、リン酸カルシウムからなる石灰化物質であると共に、種々の微生物の生息地でもある。口腔内で増殖している細菌は、ストレプトコッカス ミュータンス (*Streptococcus mutans*) や乳酸桿菌 (*Lactobacilli*) のような空気に対する耐性を有する嫌気性細菌や、数種の好気性細菌を含む。しばしば、唾液からの酸性の糖たんぱく質が歯に付着し、そこでストレプトコッカス ミュータンスが増殖して、そして嫌気性の細菌の層を形成するための不溶性のグルカンを生成する。細菌の層の嫌気性環境が、種々の嫌気性微生物に生息地を供給し、そしてそれら微生物によって生成された酸性の物質が、歯のエナメル質層を脱灰し、むし歯を発生させる。それゆえに、ストレプトコッカス ミュータンスは、むし歯の発生の主要な原因となっている。

【0003】微生物学では古くから、歯石を形成する細菌についての研究が継続して実行されてきた。その結果、歯石の形成を阻止する次のような方法が提案された：第一は、スピラマイシン、塩酸バンコマイシンやクロロヘキシジン等のような抗生物質を使用する方法；第二は、無機又は有機のフッ化物により、むし歯を発生させる細菌の増殖を抑制する方法；第三は、グルカナーゼやデキストラナーゼ等のような酵素を使用して、プラークを除去する方法。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のうち、最初の方法は、むし歯を防止するためには効果的であるが、抗生物質の使用による薬物耐性株の出現や、下痢や嘔吐等のような潜在的な副作用や、通常の生理的寄生菌を含む、

口腔で生活するすべての細菌の非特異的な規制によりもたらされる、偶然の感染や他の疾病という、いくつかの欠点を示した。

【0005】フッ化物を使用する二番目の方法は、再石灰化を抑制し、そして歯に輝きをもたせるために、広く使用されてきたが、これには歯に白いスポットができるという不利がある。

【0006】グルカナーゼやデキストラナーゼ等のような酵素を使用する第三の方法は、高い可能性のあることで知られているが、歯石を除去するためには幾分間接的な方法であることが分かっている。

【0007】上記のような状況下、最終的にはむし歯を予防するために、歯石を形成する細菌に対し選択的且つ特異的態様で作用する、新規な物質の探索と開発のための強い理由がある。上記見地から、口腔衛生のための安全で、そして効果的な薬剤が、むし歯を発生させる細菌を分解する酵素の適用によって開発できることが提案された。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の発明者らは、ストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産成する微生物を分離し、そしてその微生物を、形態学、生化学及び生理学の観点から公知の株とは完全に異なる、バチルス エスピー (*Bacillus sp.*) と特定した。更に、発明者らは、その微生物が従来の細胞壁加水分解酵素とは全く異なる物理化学的特徴を有する、新規な加水分解酵素を産生することを発見した。

【0009】それゆえに本発明の第一の目的は、ストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産成する微生物を提供することである。

【0010】本発明の他の目的は、上記微生物により産成された新規な加水分解酵素を提供することである。

【0011】

【発明の実施の態様】本発明の上記と他の目的及び特徴は、添付図面と以下の記載から明らかになる。

【0012】細胞壁を分解する加水分解酵素活性を有する微生物を表土環境から選択するために、寒天培地平板に接種されたストレプトコッカス ミュータンスの集落の上に明白な帯域を与える微生物株が探索された（図1を参照）。その結果、次のような特徴を有する桿状のグラム陽性の細菌が、最終的に選択された（表1を参照）。

【0013】

【表1】

バチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) の形態学、生化学及び生理学上の特徴

特徴	バチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090)
形状	桿状
グラム染色性	陽性
胞子形成	+
カタラーゼ	+
嫌気性生育	+
酸の産生	
D-グルコース	+
L-アラビノース	-
D-キシロース	+
D-マンニトール	+
炭水化物の分解	
カゼイン	+
ゼラチン	+
スターチ	+
酸の利用	
クエン酸	+
プロピオン酸	
チロシンの分解	-
フェニルアラニンの測定	-
インドールの生成	
成育の pH	
6.8 (栄養液)	+
5.7	+
培養温度	
5°C	+
10°C	+
30°C	+
40°C	+
50°C	+
55°C	+

【0014】株の形態学、生化学及び生理学上の特徴についての研究の結果、例えば、分子量が11,000ダルトン及び20,000ダルトンでムタノライシン (mutanolysin) を産生するストレプトミセス属 (Streptomyces) や、分子量が11,000ダルトンで酵素を産生するバチルス属 (Bacillus) のような、ストレプトコッカス ミュータンスを分解する加水分解酵素を産生する公知の細菌に照らし、選択された株が、細胞壁加水分解酵素を産生する従来の株とは完全に異なる新規の微生物であることが示された。それゆえに発明者は、上記株が新規なものであると結論を下し、そして微生物をバチルス エスピーYU-1005と指定した。バチルス エスピーYU-1005は、1996年4月8日付けで、国際寄託機関である韓国微生物培養センター (the Korean Culture Center of Microorganism [KCCM]) に、寄託番号KCCM-10090として寄託された。

【0015】好ましくは、バチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) は、最大の酵素生産性を与えるために、1%のグルコース、0.5%のポリペプトン及び0.5%の酵母菌抽出物を含んでいる pH 7 に調整された発育媒体中で、嫌気性条件下、37°Cの温度で培養される。

【0016】バチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) によって産生された細胞壁加水分解酵素は、27,000

ダルトンの分子量を有している単量体 (YU 103) と、45,000ダルトンの分子量を有している単量体 (YU 104) の二種類としてそれぞれ単離され、それらの至適 pH と温度は8.0及び60°Cであった。

【0017】

【実施例】本発明は、以下の実施例で更に詳しく説明されるが、実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

【0018】実施例1

バチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) は、最大の酵素生産性を与えるために、1%のグルコース、0.5%のポリペプトン及び0.5%の酵母菌抽出物を含んでいる媒体中で、37°Cの温度で18時間培養され、以下、これを酵素液として使用した。酵素活性の測定のために、基質株であるストレプトコッカス ミュータンスKCTC 3283 が、BHI (Brain Heart Infusion [Difco]) 媒体中、37°Cで3日間培養された。その後、微生物は遠心法によって収穫され、生理的食塩水で二度洗浄され、そして-20°Cで貯蔵された。基質株は、OD_{660nm}が1.0となるように、緩衝液 (pH 8.0) で再度懸濁された。そして、0.2mlの酵素液が2mlの細胞懸濁液に加えられ、37°Cで30分間培養され、660nmにおける吸収度変化が測定された。この点に関して、上記の状態の

下で1分間に660nmにおける吸収度を0.001だけ減少させた酵素の量を、1単位の酵素活性と規定した。

【0019】実施例2

実施例1と同様にして、バチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) が培養された。図4は、株の発育、酵素の産生及びpHの変化を示すグラフである。図4に示されているように、株は接種後13時間発育して定常期に入った。媒体のpHは当初7であったが、13時間後に6に減少し、そして再度8に増加した。約5時間の培養後に酵素の産生は増加し始め、18時間の培養により最大の酵素活性である25単位/mlが得られた。

【0020】実施例3

上記のようにして調製されたバチルス エスピーYU-1005 (KCCM-10090) の培養物の1リットルから、メタノール沈殿法、CM-セルロース(Sigma, USA)を使用したカチオン交換クロマトグラフィー、セファデックスG-75 (Sigma, USA)を使用したゲル濾過及びハイドロキシアパタイト(Bio-Rad)クロマトグラフィーにより、加水分解酵素が精製された。最終的に、加水分解酵素はハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により次のように特徴付けられる2種類に単離された；一方は、27,000ダルトンの分子量を有している単量体(YU II)と、他方は、45,000ダルトンの分子量を有している単量体(YU III) (図5を参照)。

【0021】実施例4

2種類の加水分解酵素は以下のように特徴付けられた：2種類の加水分解酵素の至適pHは8.0であり、中性からアルカリ条件となるpH6.0から11において、

50%或いはそれ以上の活性と、約100%という高い安定性が維持されていた(図6及び7を参照)。

【0022】実施例5

加水分解酵素の作用部位を調査するため、基質株であるストレプトコッカスミュータンスKCTC 3283が酵素液と、最適条件下で1時間反応され、その後、シリカゲルを使用した薄層クロマトグラフィーが実行された。その結果、加水分解酵素はペプチド-グリカン細胞壁のアミノ酸配列を分解するエンドペプチダーゼであることが判明した。

【0023】実施例6

細胞壁加水分解酵素の特異性を調査するため、以下の表2に示す口腔内及び腸内細菌、グラム陽性及び陰性細菌が試験細菌株として使用された。それぞれの株は、24時間培養され、同じ緩衝液(pH8.0)にOD660nmが0.5となるように懸濁された。そして、20単位の酵素が2mlの反応液に加えられ、37℃の温度で30分間培養された。660nmにおける吸収度変化が測定され、結果はストレプトコッカス ミュータンスKCTC 3283の分解に対する相対比として、表2に要約された。

【0024】表2に明らかなように、本発明の加水分解酵素は、種々のストレプトコッカスミュータンス、そしてラクトバシラス属に対して高い活性があることが分かる。しかしながら、酵素は他の真核生物的な微生物には活性を示さず、これは、酵素が虫歯の原因となる細菌に特異的に作用することを意味する。

【0025】

【表2】

細胞壁加水分解酵素の活性

株	寄託番号 (KCCM)	相対活性 (%)
グラム陽性細菌		
ラクトバシラス プランタルム (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	11322	72
ストレプトコッカス ミュータンス 3283 (<i>Streptococcus mutans</i> 3283)	40103	100
ストレプトコッカス ミュータンス 3283 凍結解凍法で処理		187
ストレプトコッカス ミュータンス ATCC3289		60
ストレプトコッカス ミュータンス MT8148		40
ストレプトコッカス ソブリヌス (<i>Streptococcus sobrinus</i>)	11897	55
ラクトバシラス カゼイ (<i>Lactobacillus casei</i>)	35465	30
ラクトバシラス アシドフィルス (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	32820	0
グラム陰性細菌		
エッセリシャー コリ (<i>Escherichia coli</i>)	35477	10
放線菌		
ストレプトマイセス グリセウス (<i>Streptomyces griseus</i>)	11222	0
ノルカディア アマリア (<i>Nocardia amarillae</i>)	40115	0
酵母菌		
カンディダ アルビカンス (<i>Candida albicans</i>)	11474	16
サッカロミセス セレビシア (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	32016	0
糸状菌		
ペニシリウム クリソゲナム (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	34708	0

【0026】以上から明らかなように、本発明は、むしろ菌を発生させる細菌であるストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産生する新規なバチルス エスピーを提供する。本発明のバチルス エスピーにより産生された加水分解酵素は、液体、ペースト又は固体として、食品、歯磨き及び薬品の活性成分として適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本寒天培地板上のストレプトコッカス ミュータンスの分解パターンを示している写真である。

【図2】ストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産生する微生物を示している光学顕微鏡写真である。

【図3】ストレプトコッカス ミュータンスの細胞壁を分解する加水分解酵素を産生する微生物を示している電

子顕微鏡写真である。

【図4】本発明のバチルス エスピーからの酵素生産量の経時的变化を示しているグラフである。

【図5】精製した加水分解酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動パターンを示している写真である。

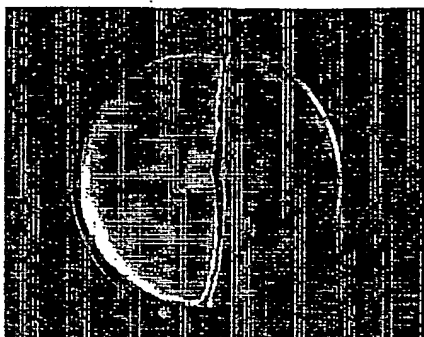
【図6】精製した加水分解酵素の反応に対するpHの影響を示しているグラフである。

【図7】精製した加水分解酵素の安定性に対するpHの影響を示しているグラフである。

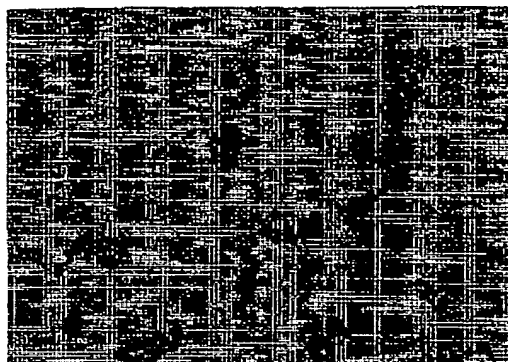
【図8】精製した加水分解酵素の反応に対する温度の影響を示しているグラフである。

【図9】精製した加水分解酵素の安定性に対する温度の影響を示しているグラフである。

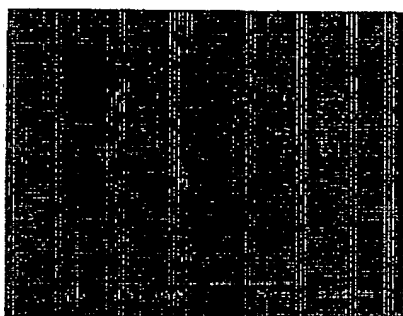
【図1】



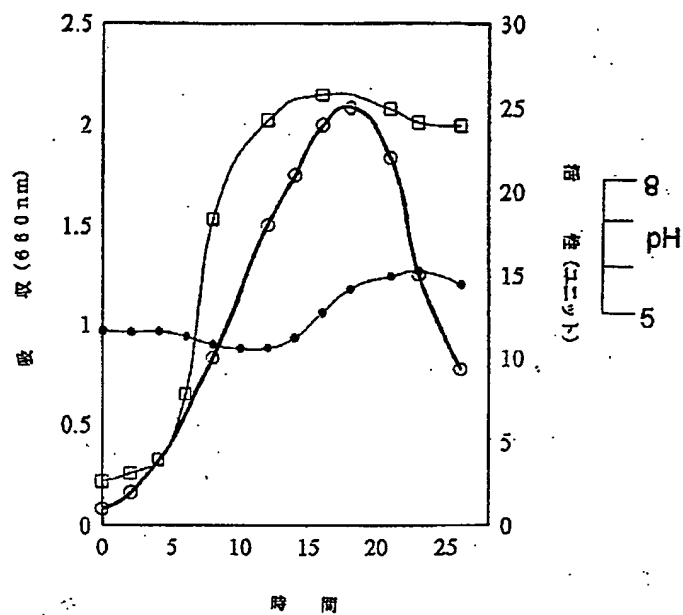
【図2】



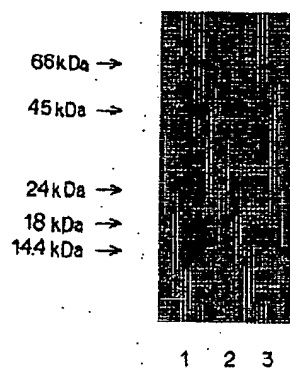
【図3】



【図4】

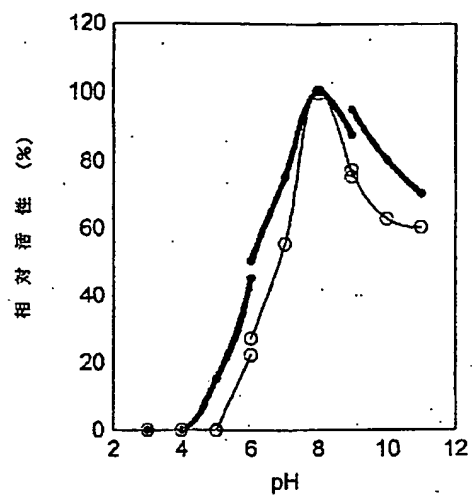


【図5】



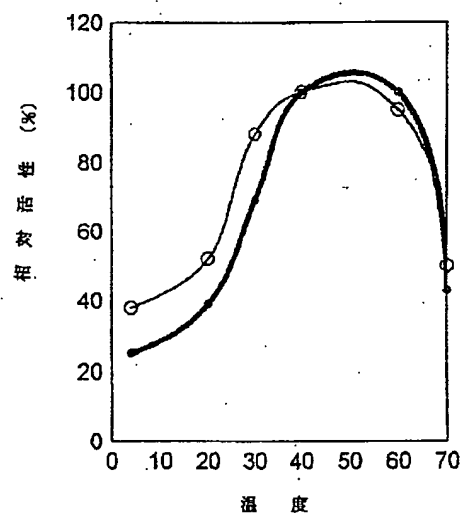
1. 分子量スタンダード
2. 分子量45,000ダルトンの単量体
3. 分子量27,000ダルトンの単量体

【図6】



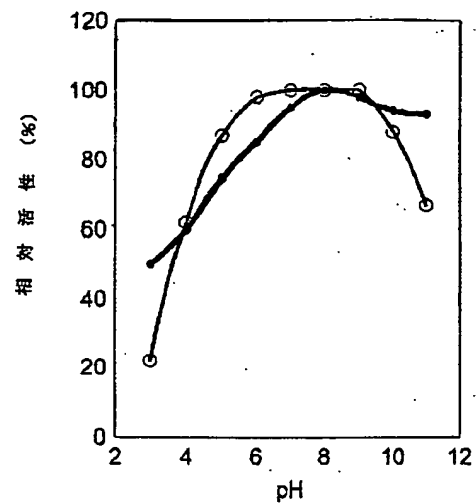
● 分子量 27,000ダルトン
○ 分子量 45,000ダルトン

【図8】

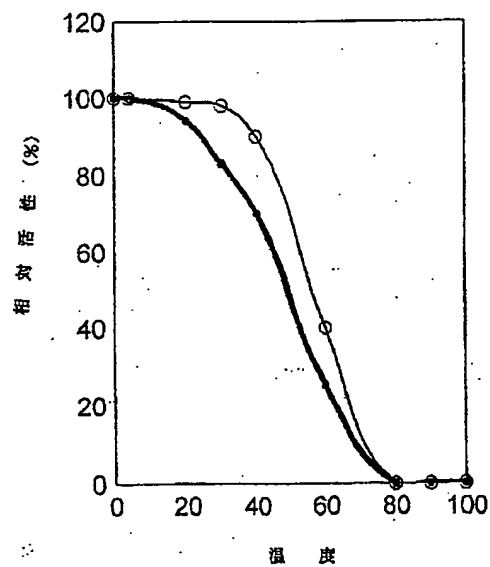


● 分子量 27,000ダルトン
○ 分子量 45,000ダルトン

【図7】



● 分子量 27,000ダルトン
○ 分子量 45,000ダルトン
【図9】



● 分子量 27,000ダルトン
○ 分子量 45,000ダルトン

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

(C 1 2 N 9/14

C 1 2 R 1:07)

(72) 発明者 金 素影

大韓民国京畿道果川市中央洞 住公アパー
ト1005棟503号

(72) 発明者 ▲べ▼ 東薫

大韓民国忠清南道天安市星井洞 住公6団
地アパート305棟106号

(72) 発明者 呉 斗煥

大韓民国ソウル市西大門区新村洞134番地
延世大学校内

(72) 発明者 南 承佑

大韓民国ソウル市瑞草区瑞草洞1450-7
株式会社ブルムウォンソウル事務所内

(72) 発明者 呂 翼鉉

大韓民国ソウル市西大門区延禧洞15-1
株式会社ブルムウォン技術研究所内

(72) 発明者 柳 洲鉉

大韓民国ソウル市西大門区新村洞134番地
延世大学校内